

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月19日

国立大学法人愛媛大学  
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関：北海道大学

部局・職名：大学院歯学研究院・教授

氏名：飯村忠浩

1. 研究課題

ヒト・プロテインアレイを用いた新規骨代謝改善薬の探索

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 飯村忠浩	北海道大学 大学院 歯学研究院	教授	骨の組織および細胞のイメージング解析
研究分担者 竹田浩之	愛媛大学プロテオサイエンスセンター プロテオ創薬科学部門	准教授	生化学的実験法およびスクリーニング系の構築
李 智媛	北海道大学 大学院 歯学研究院	助教	細胞生物学的解析および生化学的実験
澤崎達也	愛媛大学プロテオサイエンスセンター 無細胞生命科学部門	教授	生化学的実験

### 3. 研究成果

申請者らは、ローズマリーなどのシソ科植物に含まれるポリフェノール類であるロスマリン酸が、骨代謝改善薬として機能することを明らかにしてきた。骨粗鬆症モデルマウスへの投与では、ロスマリン酸は骨形成を促進し、骨吸収を抑制することで骨量および骨代謝を改善することを示した。また、細胞分子レベルの実験においても、ロスマリン酸は骨芽細胞の分化を促進する一方で、破骨細胞の分化を抑制した。このように、ロスマリン酸は理想的な骨代謝改善薬すなわち骨粗鬆症治療薬として作用することが明らかになったが、その分子標的は不明である。したがって、本研究では、ロスマリン酸の分子標的およびシグナルの探索を目的とする。澤崎教授らとの共同研究により、ロスマリン酸のビオチン化に成功している。また、細胞生物学的解析から、ビオチン化ロスマリン酸には生物活性があること、また膜タンパクを介して機能している可能性が高いことを明らかにしている。

本共同研究の過程で、培養骨芽細胞および破骨細胞の実験系において、ビオチン化ロスマリン酸が、未標識ロスマリン酸と同様の生物活性を示すかどうかを詳細に検討してきた。その結果、ビオチン化ロスマリン酸も、未標識のものと同様に生理活性を有することが明らかになってきた。2020年度は、培養細胞解析系をより純化すべく、これまでの初代培養による解析から細胞株による解析系への移行を行なった。マウスマクロファージ系培養細胞であるRAW264.7による解析を行い、ビオチン化ロスマリン酸は、未標識ロスマリン酸とほぼ同様に、破骨細胞の分化と機能を抑制する効果があることが明らかとなった。現在、マウス骨芽細胞様株細胞であるMC3T3-E1を用いた解析を進めている。

抗ビオチン化抗体を用いた破骨細胞の細胞膜タンパク質の免疫沈降実験により、標的タンパク質の同定を試み、ビオチン化ロスマリン酸に特異的に結合する分子の探索を進めている。また、ヒト・プロテインアレイあるいは膜タンパク質アレイを用いたスクリーニングにより、ロスマリン酸の標的分子を探索するための基盤構築を進めている。2020年度は、竹田研において、GPCR（約700クローン）、イオンチャネル（約200クローン）のリポソームライブラリーを構築した。また、一回膜貫通型受容体（約700クローン）のライブラリーも構築している。そこで、ロスマリン酸標的分子の同定を目指し、8Kアレイを用いてスクリーニングする方針を決め、スクリーニングプロトコルを確定した。